

University of Groningen

## Microbial ecology at the International Space Station

van Tongeren, Sandra Pauline

DOI:  
[10.33612/diss.2496925](https://doi.org/10.33612/diss.2496925)

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*  
2011

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*  
van Tongeren, S. P. (2011). *Microbial ecology at the International Space Station: the use of rapid and easy molecular methods for the quantitative detection of bacteria*. s.n. <https://doi.org/10.33612/diss.2496925>

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

# **Chapter 9**

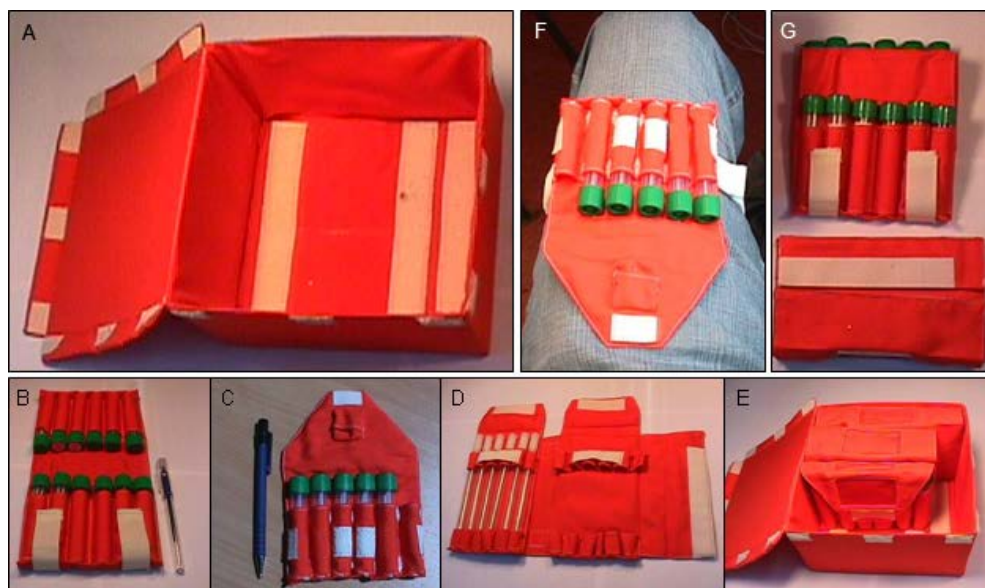
## **Summary and General Discussion**

The aims of the studies described in this thesis were to (i) study which effect spaceflight conditions have on the normal microbiota of the crew; (ii) map the dynamics of microbial contamination on board of the ISS and gain insight in which locations are most susceptible to microbial growth; and (iii) develop molecular methods for the rapid and easy on-site detection and quantification of hazardous microbes and to apply these methods during the implementation of the former aims.

The results presented in **Chapter 2** and **Chapter 3** confirmed that the steps of sampling and sample processing that precede the actual measurement with a molecular detection and quantification method such as qrtPCR are crucial for reliable quantification, but also showed that these steps at present are still very crude. Several sampling systems and DNA extraction methods were evaluated for their suitability to selected criteria for the rapid, easy and on-site quantification of bacterial DNA. When used pre-moistened, the median recovery efficiency of the four evaluated sampling systems Dacron<sup>®</sup>, viscose, gauze and nylon flocked swab ranged between 35 percent for gauze and 105 percent for the nylon flocked swab system, the latter displaying a large variance (**Chapter 2**). The recovery of DNA from defined numbers of bacterial cells that were subjected to three different DNA extraction methods, the QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit, Reischl et al.'s method<sup>17</sup> and FTA<sup>®</sup> Elute, was measured using qrtPCR for *E. coli* and *S. aureus* (**Chapter 3**). Of these three methods, FTA<sup>®</sup> Elute significantly showed the highest median DNA extraction efficiency of 76.9% for *E. coli* and 108.9% for *S. aureus*. It was also shown, that of the three DNA extraction methods, FTA<sup>®</sup> Elute was the only method that did not inhibit the qrtPCR assays for *E. coli* and *S. aureus*. Overall, the combination of the pre-moistened nylon flocked swab system with the FTA<sup>®</sup> Elute method was found to be most suitable to selected criteria for the on-site quantitative recovery of bacterial DNA from solid surfaces in terms of rapidity and easiness of use, efficiency, toxicity and storage and transport requirements. Ideally, for accurate quantification, the combined contribution of the average efficiency and variance of the used sampling system and DNA extraction method to the quantification of the methods as a whole would need to be taken into account.

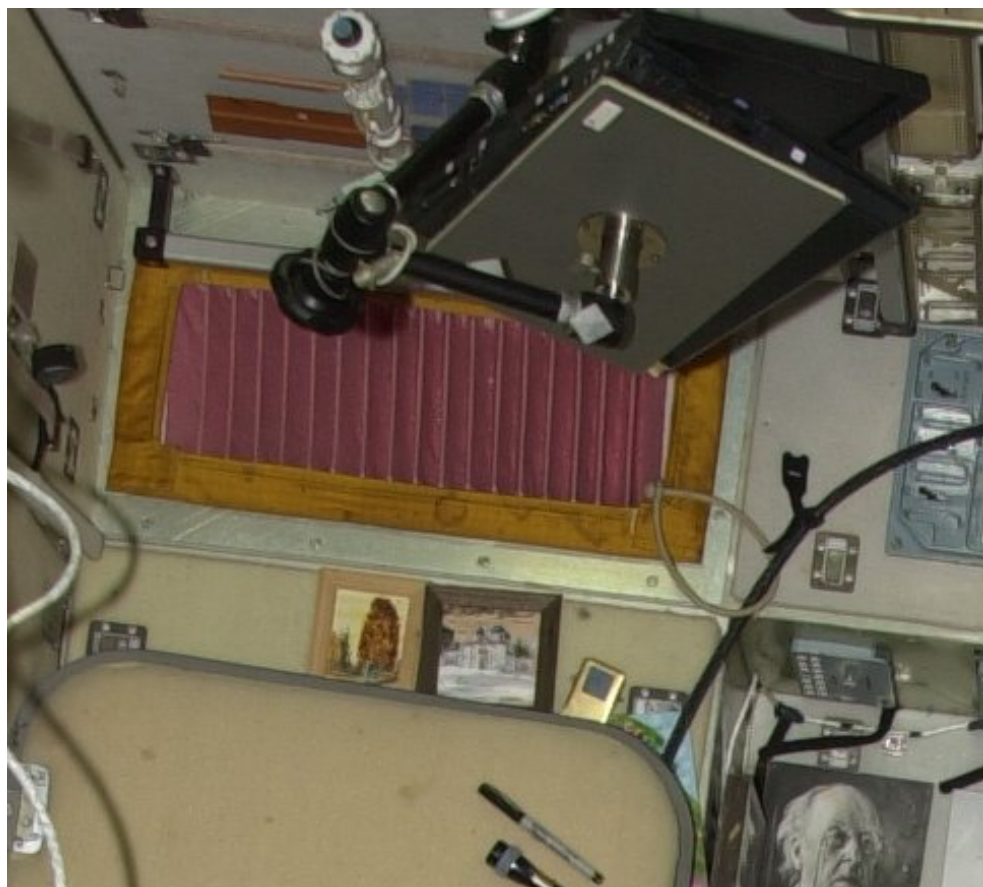
During the development of the methods it became apparent that for cells of some species such as *S. aureus* a huge discrepancy in DNA extraction yields occurs under distinct environmental conditions. More specifically, the DNA yield after extraction with a liquid DNA extraction method was significantly higher (three to eleven-fold) from cells that were pre-applied, dried-up on glass surface and swabbed as compared to cells that remained in liquid suspension (**Chapter 4**). This finding is against the general assumption that cells used for the generation of a standard for quantitative molecular methods such as qrtPCR or spiking in experimental settings release DNA with the same efficiency as cells that are to be sampled<sup>5,7,13</sup>. The effect demonstrated with *S. aureus* cells can easily lead to a severe over-estimation of sampled cells when cell counts are used within a standard, as the amount of DNA released from the cells used for the standard or spiking experiment can significantly differ from that of sampled cells.

The applicability of the FTA<sup>®</sup> Elute DNA extraction method and the Viscose, Dacron<sup>®</sup> and nylon flocked swab system was demonstrated with the evaluation of microbial samples taken in the frame of the ‘SAMPLE’ experiments from the microbiota of three cosmonauts and thirty-five locations of the interior of the *Zvezda* Module during several spaceflight missions to the ISS (Fig. 2).



**Figure 2. The Sample Collection Kit, developed for taking microbial samples on the ISS for the ‘SAMPLE’ experiments.** (A) Empty pouch. (B) The ‘12-pack’, used for environmental samples. (C) The ‘6-pack’, used for cosmonaut samples. (D) The ‘Culture pack’, used for samples to be cultured on Earth. (E) Packing of the pouch. (F) ‘6-pack’ on a person’s leg (with separate Velcro leg strap). (G) Folded ‘12-pack’ and closed ‘Culture Pack’.

In **Chapter 5**, the occurrence of drastic in-flight changes of the bacterial microbiota of three cosmonauts during short missions to the ISS was shown. Major shifts in terms of composition -dysbacteriosis- and numbers of the human microbiota were shown during spaceflight, often towards (potential) pathogens such as enterobacteria or staphylococci, in which several spaceflight-associated parameters may play a role. In this context it may be interesting to note, that in terrestrial studies of frailty in the elderly<sup>19</sup>, a concept which encompasses several of the variables that are also encountered during space travel such as psychosocial factors or mobility, similar increases of enterobacteria as well as a reduction of lactobacilli have been observed. The study described in **Chapter 5** demonstrates how the human bacterial microbiota adapts during short duration spaceflight to the extreme environment constituted by the ISS and subsequently appears to return to pre-flight numbers and composition when returning to post-flight ground conditions.



**Figure 3.** Airgrid aboard the *Zvezda* Module of the *International Space Station*, one of the sampling locations of the ‘SAMPLE’ experiments. Photo: Andre Kuipers.

With the results of DGGE analysis of samples taken from the *Zvezda* interior, a map could be drawn of microbial contamination and several ‘hot spots’, i.e. locations with increased bacterial activity, could be identified, such as the airgrid right to the toilet cabin door (Fig. 3), toilet cabin (Fig. 4), food consumption area and computers, as described in **Chapter 6**. 16S rDNA sequence analysis of selected bands in DGGE profiles provided detailed information on the bacterial species that were present in these hot spots. The results of clone libraries generated from samples taken from the airgrid and the nozzle and surrounding of the Russian potable warm water container (Fig. 5) were in good agreement with the results of the sequence analysis of DGGE bands. In the airgrid, various taxa were identified such as *Neisseriaceae*, *Streptococcus* sp., *Granulicatella* sp., *Peptoniphilus* sp., and *Corynebacterium* sp. The nozzle and surrounding of the warm water container appeared to be contaminated with bacteria of taxa such as *Sphingomonas paucimobilis*

group, *Lactobacillus* sp., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* sp., *Streptococcus thermophilus* group, *Microbacterium* sp. and *Delftia* sp., as confirmed by both methods.



**Figure 4.** Sanitary facility aboard the *Zvezda* Module of the *International Space Station*, one of the sampling locations of the ‘SAMPLE’ experiments. Photo: Andre Kuipers.

Quantification of the level of bacterial contamination by qrtPCR showed that the average level of bacterial DNA of selected species corresponded with approximately  $2 \times 10^4$  bacterial cells for most locations that were sampled in the *Zvezda* Module. These levels are in agreement with routine hygiene measures taken aboard the ISS aimed to keep bacterial levels below the acceptability limit of  $10^4$  colony forming units per  $100 \text{ cm}^2$ <sup>211,14</sup>. Furthermore, bacterial DNA was detected of potential pathogens such as *E. coli*, the pathogen *Legionella pneumophila* and the technophile *Delftia acidovorans*.

In addition to the advantages of molecular methods as mentioned in **Chapter 1**, they have the advantage of being more robust as opposed to culturing techniques, which, for storage and transport of samples for analysis on Earth, requires the use of a microbial transport medium, cooling facilities and the shortest possible transport time to prevent possible cell death or cell growth, the latter two of which are difficult to realise for space samples. A limitation of using a molecular method is that it detects both viable and non-viable cells, however the presence of bacterial DNA is a clear indication that bacterial activity has occurred.





**Figure 5.** Russian potable warm water container aboard the *Zvezda* Module of the *International Space Station*, one of the sampling locations of the ‘SAMPLE’ experiments. Photo: Andre Kuipers.

A large part of bacterial species is yet unknown<sup>20</sup> and as such, can not be identified during surveys of microbial contamination. An example of this is described in **Chapter 7**, where an unidentifiable Gram-positive, motile, rod-shaped, endospore-forming facultative aerobic bacterial strain was isolated from the interior of the *Zvezda* Module. Based on the phenotypic characteristics, the intragenomic heterogeneity of its 16S rRNA genes and the results of phylogenetic analysis of the 16S rDNA sequences, it was proposed that the strain represents a novel species of the genus *Bacillus*, for which we propose the name *Bacillus zvezdaensis* sp. nov. The novel strain appeared to possess at least 10 distinct types of 16S rRNA genes, differing most prominently at 65 nucleotide positions in 5 variable regions, suggesting that all 16S rRNA molecules are functional. Remarkably, the sequence similarity among the strain’s 16S rDNA sequences was 95.7-98.0 %, which may complicate detection by molecular methods targeting the 16S rRNA gene.

Rapid detection of virulent *B. anthracis* in the environment is essential since the infection spreads rapidly and has a high mortality rate<sup>16</sup>. The correct identification of *B. anthracis* however is challenging, both by conventional culturing techniques and molecular methods, due to its close relationship to *B. cereus* and other members of the *B. cereus* group<sup>9,12,15,16</sup>. Apart from this, determining the virulence of *B. anthracis* by molecular methods is troublesome. The virulence of *B. anthracis* depends on the possession of two virulence plasmids, pXO1 and pXO2<sup>1,10</sup>. *B. anthracis* isolates may lack one or both of the

virulence plasmids<sup>2,18</sup> and vice versa, the plasmids or homologues thereof can occur in other closely related species such as *B. cereus*<sup>3,4,6,8,12,15</sup>. Due to these factors, rapid and on-site molecular detection of virulent *B. anthracis* is problematic when other closely related species that may contain the plasmids pXO1 and pXO2 or their homologues are present within the same sample, since the present molecular methods can not determine if both plasmids are present within the same strain of *B. anthracis*. This is especially the case in environments such as the ISS where build-up of *Bacillus* spores can occur and multiple representatives of the *B. cereus* group may be present<sup>11</sup>. This was illustrated in **Chapter 8**, where *B. anthracis*-like bacteria and other members of the *B. cereus* group were shown to be present in samples taken from the same environment, the interior of the *Zvezda* Module. As such, the risk assessment of the microbial hygiene situation and whether it is becoming dangerous to human health is difficult to predict for species such as virulent *B. anthracis*, before the occurrence of a clinical case.

### Future perspectives and concluding remarks

The molecular methods developed so far appear to be suitable for the intended applications, such as the rapid and easy monitoring of microbial contamination on board of a spacecraft such as the ISS, or comparable environments on Earth. Future research may aim at the further development and optimisation of automated and miniaturised qrtPCR methods with integrated sampling and sample processing protocols for the detection and quantification of hazardous microbes, however for some bacterial species molecular detection will remain challenging.

The results of the ‘SAMPLE’ experiments have identified locations aboard the *Zvezda* Module with increased bacterial activity, which, first of all, presents good candidates for intensified routine monitoring of microbial hygiene. Secondly, the knowledge of which bacterial species are present at such hot spots can aid in the development of expanding the list of hazardous microbes that can be detected by the molecular methods.

How the observations of extreme changes of the human microbiota under spaceflight conditions precisely relate to health and disease and what the implications will be for extended duration space travel remains to be investigated. The risk of microbiological diseases may be increased under spaceflight conditions, not only by a lowered resistance against pathogens due to a negatively affected immune system of the bacterial host, but also by a lowered colonisation-resistance against pathogens due to dysbacteriosis. We anticipate that our study will instigate progressive research on in-flight human microbiota adaptations in relation to health and disease.

Most importantly, microbiota management needs to be a serious consideration, particularly in view of extended space travel such as anticipated manned missions to Mars.



### References

1. **Edwards KA, Clancy HA and Baeumner AJ** (2006). *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Anal Bioanal Chem* 384:73-84.
2. **Fasanella A et al.** (2001). Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. *Vaccine* 19:4214-4218.
3. **Hoffmaster AR et al.** (2006). Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J Clin Microbiol* 44:3352-3360.
4. **Hoffmaster AR et al.** (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8449-8454.
5. **Khan IUH et al.** (2007). Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *J Microbiol Methods* 69:480-488.
6. **Klee SR et al.** (2006). Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Côte d'Ivoire and Cameroon. *Journal of Bacteriology* 188:5333-5344.
7. **Lee SH et al.** (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *J Vet Sci* 10:43-51.
8. **Leendertz FH et al.** (2006). A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog* 2:e8.
9. **Logan NA and de Vos P** (2009). Genus I. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 edn. Springer Science+Business Media, New York, USA, pp 21-128.
10. **Logan NA, Popovic T and Hoffmaster A** (2007). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9 edn. Murray PR et al. (eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp 455-473.
11. **Novikova N et al.** (2006). Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res Microbiol* 157:5-12.
12. **Okinaka R, Pearson T and Keim P** (2006). Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *PLoS Pathog* 2:e122.
13. **Peters RPH et al.** (2007). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit. *J Clin Microbiol* 45:3641-3646.
14. **Pierson DL** (2001). Microbial contamination of spacecraft. *Gravit Space Biol Bull* 14:1-6.
15. **Pilo P and Frey J** (2011). *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect Genet Evol* 11:1218-1224.

16. **Rao SS, Mohan KVK and Atreya CD** (2010). Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges. *J Microbiol Methods* 82:1-10.
17. **Reischl U *et al.*** (2000). Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 38:2429-2433.
18. **Turnbull PC *et al.*** (1992). *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol* 72:21-28.
19. **van Tongeren SP, Slaets JPI, Harmsen HJM and Welling GW** (2005). Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71:6438-6442.
20. **Zengler K *et al.*** (2008). Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back. ASM Press, Washington, DC.



## **Nederlandse Samenvatting en Algemene Discussie**

De doelstellingen van de onderzoeken die in deze thesis zijn beschreven waren om (i) te bestuderen welke effecten ruimtevaart condities hebben op de normale microbiota van de bemanning; (ii) de dynamica van microbiële contaminatie aan boord van het ISS in kaart te brengen en inzicht te verwerven over welke locaties het meest vatbaar zijn voor microbiële groei; en (iii) moleculaire methoden te ontwikkelen die ter plaatse gebruikt kunnen worden voor de snelle en gemakkelijke detectie en kwantificering van gevaarlijke microben en deze methoden toe te passen bij de uitvoering van de eerst genoemde doelstellingen.

De in **Hoofdstuk 2** and **Hoofdstuk 3** gepresenteerde resultaten bevestigden dat de stappen van bemonsteren en monsterverwerking die voorafgaan aan de daadwerkelijke meting met een moleculaire detectie en kwantificering methode zoals qrtPCR cruciaal zijn voor betrouwbare kwantificering, maar lieten ook zien dat deze stappen momenteel nog erg grof zijn. Een aantal bemonsteringssystemen en DNA extractie methoden werd geëvalueerd op hun geschiktheid voor geselecteerde criteria voor de snelle en gemakkelijke kwantificering van bacterieel DNA die ter plaatse kan worden toegepast. Indien voorbevochtigd varieerde de gemiddelde winnings efficiëntie van de vier geëvalueerde bemonsteringssystemen Dacron<sup>®</sup>, viscose, gaas en behaarde nylon swab tussen 35 procent voor gaas en 105 procent voor het behaarde nylon swab systeem, waarbij de laatstgenoemde een grote variantie vertoonde (**Hoofdstuk 2**). Het winnen van DNA van vastgestelde hoeveelheden bacteriële cellen die werden onderworpen aan drie verschillende DNA extractie methoden, de QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit, de methode van Reischl et. al.<sup>17</sup> en FTA<sup>®</sup> Elute, werd gemeten met qrtPCR voor *E. coli* en *S. aureus* (**Hoofdstuk 3**). Van deze drie methoden vertoonde FTA<sup>®</sup> Elute significant de gemiddeld hoogste DNA extractie efficiëntie van 76.9% voor *E. coli* en 108.9% voor *S. aureus*. Ook werd aangetoond, dat van de drie DNA extractie methoden FTA<sup>®</sup> Elute de enige methode was die de qrtPCR assays voor *E. coli* en *S. aureus* niet remde. Over het geheel genomen werd de combinatie van het voorbevochtigde behaarde nylon swab systeem met de FTA<sup>®</sup> Elute methode het meest geschikt bevonden voor geselecteerde criteria voor het ter plaatse kwantitatieve winnen van bacterieel DNA van vaste oppervlakten in termen van snelheid en gemak in het gebruik, efficiëntie, toxiciteit en opslag en transport vereisten. Voor accurate kwantificering zou, in het ideale geval, rekening moeten worden gehouden met de gecombineerde bijdrage van de gemiddelde efficiëntie en variantie van het gebruikte bemonsteringssysteem en de DNA extractie methode aan de kwantificering van de methoden als geheel.

Tijdens de ontwikkeling van de methoden werd duidelijk dat voor cellen van sommige soorten zoals *S. aureus* een grote discrepantie optreedt in DNA extractie opbrengst onder verschillende omgevings condities. Om precies te zijn, na extractie met een vloeistof DNA extractie methode was de DNA oplage significant hoger (drie tot elfvoudig) van cellen die op een glazen oppervlakte waren opgebracht, opgedroogd en bemonsterd, in vergelijking tot cellen die in vloeistof suspensie bleven (**Hoofdstuk 4**). Deze bevinding gaat in tegen de algemene aanname dat cellen die worden gebruikt voor de vervaardiging van een standaard curve voor kwantitatieve moleculaire methoden zoals qrtPCR, of spiking in experimentele

settings, DNA vrijlaten met dezelfde efficiëntie als cellen die zullen worden bemonsterd<sup>5,7,13</sup>. Het effect zoals dat werd gedemonstreerd met *S. aureus* cellen kan gemakkelijk leiden tot een ernstige overschatting van bemonsterde cellen indien cel tellingen worden gebruikt in een standaard curve, aangezien de hoeveelheid DNA die vrijkomt van de cellen die worden gebruikt voor de standaard of het spiking experiment significant kan verschillen van dat van bemonsterde cellen.

De toepasbaarheid van de FTA<sup>®</sup> Elute DNA extractie methode en het Viscose, Dacron<sup>®</sup> en behaarde nylon swab systeem werd gedemonstreerd met de evaluatie van microbiële monsters die werden genomen in het kader van de ‘SAMPLE’ experimenten van de microbiota van drie cosmonauten en vijfendertig locaties van het interieur van de *Zvezda* Module gedurende meerdere ruimtevaart missies naar het ISS (Fig. 2, **Hoofdstuk 9**).

In **Hoofdstuk 5** werd het optreden van drastische veranderingen van de bacteriële microbiota van drie cosmonauten tijdens de vlucht gedurende korte missies naar het ISS aangetoond. Aanzienlijke verschuivingen in termen van samenstelling -dysbacteriosis- en aantallen van de humane microbiota werden aangetoond tijdens ruimtevlucht, vaak in de richting van (potentieel) pathogenen zoals enterobacteria of stafylococcen, waarin diverse ruimtevaart-geassocieerde parameters een rol kunnen spelen. In deze context kan het interessant zijn te bemerken, dat in Aards onderzoek over kwetsbaarheid bij ouderen<sup>19</sup>, een concept dat diverse variabelen omvat die ook worden ondervonden tijdens ruimtevaart zoals psychosociale factoren of mobiliteit, een vergelijkbare toename van enterobacteria en een reductie van lactobacillen werd waargenomen. Het onderzoek zoals beschreven in **Hoofdstuk 5** laat zien hoe de humane bacteriële microbiota zich aanpast gedurende een kort durende ruimtevlucht aan de extreme omgeving die wordt gevormd door het ISS en vervolgens post-vlucht blijkt terug te keren naar de aantallen en samenstelling van pre-vlucht.

Met de resultaten van DGGE analyse van monsters die werden genomen van het *Zvezda* interieur kon een map worden samengesteld van microbiële contaminatie en een aantal ‘hot spots’ geïdentificeerd, d.w.z. locaties met verhoogde bacteriële activiteit, zoals het luchtrooster rechts van de toilet kabine deur (Fig. 3, **Hoofdstuk 9**), de toilet kabine (Fig. 4, **Hoofdstuk 9**), het voedselconsumptie gebied en computers, zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**. 16S rDNA sequentie analyse van geselecteerde banden in DGGE profielen verschaftte gedetailleerde informatie over de bacteriële soorten die aanwezig waren in deze hot spots. De resultaten van kloonbanken die werden gegenereerd van monsters genomen van het luchtrooster en de tuit van de Russische warm drinkwater container (Fig. 5, **Hoofdstuk 9**) waren in goede overeenstemming met de resultaten van de sequentie analyse van DGGE banden. In het luchtrooster werden diverse taxa geïdentificeerd zoals *Neisseriaceae*, *Streptococcus* sp., *Granulicatella* sp., *Peptoniphilus* sp., en *Corynebacterium* sp. De tuit van de warm water container bleek gecontamineerd te zijn met bacteriën van taxa zoals *Sphingomonas paucimobilis* groep, *Lactobacillus* sp., *Lactococcus lactis*, *Streptococcus* sp.,

*Streptococcus thermophilus* groep, *Microbacterium* sp. en *Delftia* sp., zoals bevestigd met beide methoden.

Kwantificering van de bacteriële contaminatie met qrtPCR liet zien dat het gemiddeld bacterieel DNA niveau van geselecteerde soorten correspondeerde met ongeveer  $2 \times 10^4$  bacteriële cellen voor de meeste locaties die werden bemonsterd in de *Zvezda* Module. Deze niveaus zijn in overeenkomst met routine hygiëne maatregelen genomen aan boord van het ISS die erop zijn gericht om bacteriële niveaus onder de accepteerbaarheids limiet van  $10^4$  kolonie vormende eenheden per  $100 \text{ cm}^2$  te houden<sup>11,14</sup>. Verder werd bacterieel DNA gedetecteerd van potentieel pathogenen zoals *E. coli*, de pathogeen *Legionella pneumophila* en de technofiel *Delftia acidovorans*.

Naast de voordelen van moleculaire methoden zoals genoemd in **Hoofdstuk 1**, hebben ze het voordeel meer robuust te zijn dan kweek methoden, die voor opslag en transport van monsters voor analyse op Aarde het gebruik vereisen van microbiel transport medium, koelfaciliteiten en de kortst mogelijke transport tijd om mogelijke cel dood of cel groei te voorkomen, waarvan de laatste twee moeilijk zijn te realiseren voor ruimte monsters. Een beperking bij het gebruik van een moleculaire methode is dat het zowel levensvatbare als niet-levensvatbare cellen detecteert, echter de aanwezigheid van bacterieel DNA is een duidelijke aanwijzing dat er bacteriële activiteit is opgetreden.

Een groot aantal bacteriële soorten is nog onbekend<sup>20</sup> en kan als zodanig niet worden geïdentificeerd bij surveys van microbiële contaminatie. Een voorbeeld hiervan staat beschreven in **Hoofdstuk 7**, waar een onidentificeerbare Gram-positieve, beweeglijke, staaf-vormige, endospore-vormende facultatief aerobe bacteriële stam werd geïsoleerd van het interieur van de *Zvezda* Module. Gebaseerd op de fenotypische karakteristieken, de intragenomische heterogeniteit van diens 16S rRNA genen en de resultaten van fylogenetische analyse van de 16S rDNA sequenties, is voorgesteld dat de stam een nieuwe soort van het genus *Bacillus* vertegenwoordigt, waarvoor we de naam *Bacillus zvezdaensis* sp. nov voordragen. De nieuwe stam bleek tenminste 10 verschillende types 16S rRNA genen te bezitten, die het meest prominent verschillen op 65 nucleotide posities in 5 variable regionen, hetgeen suggereert dat alle 16S rRNA moleculen functioneel zijn. Opmerkelijk is dat de sequentie gelijkenis onder de 16S rDNA sequenties van de stam 95.7-98.0 % was, hetgeen detectie door moleculaire methoden die zich op het 16S rRNA gen richten kan compliceren.

Snelle detectie van virulente *B. anthracis* in de omgeving is essentieel aangezien de infectie zich snel verspreid en een hoog sterftecijfer heeft<sup>16</sup>. De correcte identificatie van *B. anthracis* is echter een uitdaging, zowel voor conventionele kweek methoden als moleculaire methoden, als gevolg van diens nauwe verwantschap met *B. cereus* en andere leden van de *B. cereus* groep<sup>9,12,15,16</sup>. Daarnaast is de bepaling van de virulentie van *B. anthracis* door moleculaire methoden lastig. De virulentie van *B. anthracis* hangt af van het bezit van twee virulentie plasmiden, pXO1 en pXO2<sup>1,10</sup>. *B. anthracis* isolaten kunnen een of beide virulentie plasmiden missen<sup>2,18</sup> en vice versa kunnen de plasmiden of homologen



daarvan voorkomen in andere nauw verwante soorten zoals *B. cereus*<sup>3,4,6,8,12,15</sup>. Als gevolg van deze factoren is snelle moleculaire detectie die ter plaatse kan worden uitgevoerd van virulente *B. anthracis* problematisch als andere nauw verwante soorten die de plasmiden pXO1 en pXO2 of hun homologen kunnen bevatten in hetzelfde monster aanwezig zijn, aangezien de huidige moleculaire methoden niet kunnen bepalen of beide plasmiden aanwezig zijn in dezelfde stam van *B. anthracis*. Dit is in het bijzonder het geval in omgevingen zoals het ISS waar ophoping van *Bacillus* sporen kan optreden en meerdere vertegenwoordigers van de *B. cereus* groep aanwezig kunnen zijn<sup>11</sup>. Dit is geïllustreerd in **Hoofdstuk 8**, waar *B. anthracis*-achtige bacteriën en andere leden van de *B. cereus* groep werden aangetoond in monsters genomen uit dezelfde omgeving: het interieur van de *Zvezda* Module. Als zodanig is de risico bepaling van de microbiële hygiëne situatie en of dit gevaarlijk wordt voor de gezondheid van de mens moeilijk te voorspellen voor soorten zoals virulente *B. anthracis*, vóór het optreden van een klinisch geval.

### **Toekomst perspectieven en concluderende opmerkingen**

De moleculaire methoden die tot zover zijn ontwikkeld blijken geschikt te zijn voor de bedoelde toepassingen, zoals de snelle en gemakkelijke monitoring van microbiële contaminatie aan boord van een ruimtevaartuig zoals het ISS, of vergelijkbare omgevingen op Aarde. Toekomstig onderzoek kan zich richten op de verdere ontwikkeling en optimalisatie van geautomatiseerde en geminiaturiseerde qrtPCR methoden met geïntegreerde bemonsterings en monsterverwerkings protocollen voor de detectie en kwantificering van gevaarlijke microben, echter voor sommige bacteriële soorten zal moleculaire detectie een uitdaging blijven.

De resultaten van de 'SAMPLE' experimenten hebben locaties met verhoogde bacteriële activiteit aan boord van de *Zvezda* Module geïdentificeerd, hetgeen ten eerste goede kandidaten levert voor geïntensiveerde routine monitoring van microbiële hygiëne. Ten tweede kan de kennis over welke bacteriële soorten aanwezig zijn op zulke hot spots helpen bij de ontwikkeling van de uitbreiding van de lijst met gevaarlijke microben die kunnen worden gedetecteerd door de moleculaire methoden.

Hoe de observaties van extreme veranderingen van de humane microbiota onder ruimtevaart condities zich precies verhouden tot gezondheid en ziekte en wat de implicaties zullen zijn voor langdurige ruimtereizen blijft nog te onderzoeken. Het risico op microbiële ziekten kan verhoogd zijn onder ruimtevaart condities, niet alleen door een verlaagde weerstand tegen pathogenen als gevolg van een negatief beïnvloed immuunsysteem van de bacteriële gastheer, maar ook door een verminderde kolonisatie weerstand tegen pathogenen als gevolg van dysbacteriosis. We voorzien dat ons onderzoek voortschrijdend onderzoek in gang zal zetten over in-vlucht humane microbiota aanpassingen in relatie tot gezondheid en ziekte.

Bovenal moet microbiota management een ernstige consideratie zijn, in het bijzonder met het oog op langdurige ruimtereizen zoals geanticipeerde missies naar Mars.

## References

1. **Edwards KA, Clancy HA and Baeumner AJ** (2006). *Bacillus anthracis*: toxicology, epidemiology and current rapid-detection methods. *Anal Bioanal Chem* 384:73-84.
2. **Fasanella A et al.** (2001). Detection of anthrax vaccine virulence factors by polymerase chain reaction. *Vaccine* 19:4214-4218.
3. **Hoffmaster AR et al.** (2006). Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *J Clin Microbiol* 44:3352-3360.
4. **Hoffmaster AR et al.** (2004). Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8449-8454.
5. **Khan IUH et al.** (2007). Development of a rapid quantitative PCR assay for direct detection and quantification of culturable and non-culturable *Escherichia coli* from agriculture watersheds. *J Microbiol Methods* 69:480-488.
6. **Klee SR et al.** (2006). Characterization of *Bacillus anthracis*-like bacteria isolated from wild great apes from Côte d'Ivoire and Cameroon. *Journal of Bacteriology* 188:5333-5344.
7. **Lee SH et al.** (2009). A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella* spp., *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and Enteritidis in meats. *J Vet Sci* 10:43-51.
8. **Leendertz FH et al.** (2006). A new *Bacillus anthracis* found in wild chimpanzees and a gorilla from West and Central Africa. *PLoS Pathog* 2:e8.
9. **Logan NA and de Vos P** (2009). Genus I. *Bacillus*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2 edn Springer Science+Business Media, New York, USA, pp 21-128.
10. **Logan NA, Popovic T and Hoffmaster A** (2007). *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 9 edn. Murray PR et al. (eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp 455-473.
11. **Novikova N et al.** (2006). Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res Microbiol* 157:5-12.
12. **Okinaka R, Pearson T and Keim P** (2006). Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *PLoS Pathog* 2:e122.
13. **Peters RPH et al.** (2007). Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit. *J Clin Microbiol* 45:3641-3646.
14. **Pierson DL** (2001). Microbial contamination of spacecraft. *Gravit Space Biol Bull* 14:1-6.

15. **Pilo P and Frey J** (2011). *Bacillus anthracis*: Molecular taxonomy, population genetics, phylogeny and patho-evolution. *Infect Genet Evol* 11:1218-1224.
16. **Rao SS, Mohan KVK and Atreya CD** (2010). Detection technologies for *Bacillus anthracis*: prospects and challenges. *J Microbiol Methods* 82:1-10.
17. **Reischl U et al.** (2000). Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 38:2429-2433.
18. **Turnbull PC et al.** (1992). *Bacillus anthracis* but not always anthrax. *J Appl Bacteriol* 72:21-28.
19. **van Tongeren SP, Slaets JPI, Harmsen HJM and Welling GW** (2005). Fecal microbiota composition and frailty. *Appl Environ Microbiol* 71:6438-6442.
20. **Zengler K et al.** (2008). Accessing uncultivated microorganisms: from the environment to organisms and genomes and back. ASM Press, Washington, DC.

